

난백(Egg White)에서 추출한 리소좀 추출물(LOE)의 미백 효능 및 피부장벽에 관한 연구

최 다 희 · 전 경 찬* · 윤 지 희* · 민 지 호* · 박 시 준** · 김 정 수** · 황 이 택*** · 황 형 서†

세명대학교 화장품뷰티생명공학부

*전북대학교 화학공학부

**주에이씨티 기술연구소

***한국세라믹기술원

(2019년 11월 24일 접수, 2019년 12월 12일 수정, 2019년 12월 17일 채택)

Study on the Whitening Efficacy and Skin Barrier by Lysosome-related Organelle Extract (LOE) from Egg White

Da Hee Choi, Gyeongchan Jeon*, Jihee Yoon*, Jiho Min*, Si Jun Park**, Jung Su Kim**,
Ee Taek Hwang***, and Hyung Seo Hwang†

School of cosmetic science and beauty biotechnology, Semyung University, 65 Semyung-ro,
Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

*Graduate School of Semiconductors and Chemical Engineering, Jeonbuk National University,
**ACT R&D Center

***Korea Institute of Ceramic Engineering & Technology

(Received November 24, 2019; Revised December 12, 2019; Accepted December 17, 2019)

요 약: 리소좀(lysosome)은 진핵세포에서 에너지 대사 및 세포 내 소화 작용에 관여하는 세포 소기관으로 protease, nuclease, glycosidase, lipase, phosphatase 등이 다수 존재한다. 우리는 선행 연구결과들을 통해 난백 리소좀의 멜라닌 색소 탈색능을 보고하였다[8]. 그러나 B16F10 melanocyte 세포주에서 난백 리소좀에 의한 멜라닌 함량 변화 및 피부장벽 조절 연구는 거의 보고되지 않았다. 따라서 우리는 계란 난백(egg white)으로부터 추출한 lysosome-related organelle extract (LOE)에 의한 세포 내 멜라닌 함량 변화 및 피부장벽 강화 효과를 규명하고자 하였다. 먼저 LOE의 미백 효능을 확인하기 위해 B16F10 세포주를 이용하여 세포독성 평가를 진행하였다. B16F10 세포주에서 LOE에 의한 세포독성은 0에서 20 mg/mL 농도에서 관찰되지 않았으나, 40 mg/mL 부터 세포독성이 관찰되어 이후 모든 실험에서 최대 농도값을 20 mg/mL로 설정하였다. 먼저 LOE를 이용한 melanin contents assay 결과, 음성 대조군인 α -MSH 처리군 대비 LOE 처리군 5, 10, 20 mg/mL 농도에서 $61.5 \pm 4.0\%$, $61.4 \pm 7.3\%$, $58.3 \pm 8.3\%$ 로 세포 내 멜라닌 함량이 감소되는 것을 확인하였고, 20 mg/mL 농도 조건에서 MITF 발현 억제도 관찰하였다. LOE의 피부 장벽에 미치는 영향을 관찰하기 위해 각질형성세포주(HaCaT)를 이용하여 TEER (trans-epithelial electrical resistance) assay를 수행한 결과, LOE에 의해 농도 의존적으로 TEER 저항값이 증가하여 LOE가 피부장벽 강화에도 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 피부 염증 유발을 위한 TNF- α 처리조건에서도 LOE는 TEER 저항값을 증가시켜 염증 유발 조건에서도 LOE에 의해 피부장벽이 정상적으로 회복되었음을 알 수 있었다. 마지막으로 cell migration assay를 통해 LOE에 의한 세포이동 촉진 효과를 관찰한 결과, LOE는 세포분열 및 세포이동을 촉진시켰다. 위

† 주 저자 (e-mail: hshwang@semyung.ac.kr)
call: 043) 649-1618

결과들을 통해 LOE는 미백 기능 뿐 아니라 피부재생 및 피부장벽 강화에도 효과를 나타내는 소재이며, 효소 안정화 및 제형화 기술이 접목된다면 향후 새로운 미백 기능성 화장품 소재로도 개발될 수 있을 것이다.

Abstract: Lysosomes are cellular organelles involved in energy metabolism and intracellular digestion in eukaryotic cells, including protease, nuclease, glycosidase, lipase, and phosphatase. Our previous studies have confirmed that egg white lysosomes had melanin decolorization and reduction activity. However, there have been few studies on skin barrier and skin regeneration as well as inhibition of melanin production by egg white lysosomes on B16F10 melanocyte cell line. In this study, we attempted to identify the effect of lysosome-related organelle extract (LOE) extracted from egg white on the melanin content change and skin barrier enhancement in cells. First, cytotoxicity evaluation was performed on B16F10 melanocyte cell line to confirm the whitening efficacy of LOE. Cytotoxicity by LOE was not observed at 20 mg/mL concentration, but cytotoxicity was observed at 40 mg/mL, and the maximum concentration value was set to 20 mg/mL in all subsequent experiments. LOE samples of 5, 10, 20 mg/mL inhibited melanin production by $61.5 \pm 4.0\%$, $61.4 \pm 7.3\%$, $58.3 \pm 8.3\%$, respectively, compared to α -MSH, a negative control in melanin contents assay. MITF mRNA expression was reduced by about $39.7 \pm 3.2\%$ compared to the α -MSH treatment group. TEER assay using HaCaT showed that LOE increased TEER resistance in a dose-dependent manner, indicating that LOE is involved in strengthening the skin barrier. LOE also increased the TEER resistance under TNF- α treatment. Skin barrier was normally restored by LOE even under the condition of inflammation. LOE had a positive effect on cell division and cell migration promotion, confirmed by the observing the effect of promoting cell migration by LOE through cell migration assay. Taken together, we expect that LOE can be developed as a cosmetic material to enhance has effects on skin regeneration and skin barrier strengthening as well as whitening function if enzyme stabilization and formulation technology are combined.

Keywords: egg white, lysosome-related organelle extract (LOE), whitening effect, TEER, wound healing

1. 서 론

진핵세포 내 소기관인 리소좀(lysosome)은 골지체로부터 나오는 단일 막 구조의 작은 입자들로 진핵세포 내 핵산, 지방, 단백질, 다당류 등을 분해하는 다양한 가수분해효소가 존재한다. 이 내부는 인체 피부와 유사하게 pH 4.0~5.0 약산성의 특징을 나타내며 효소들 또한 약산성 조건에서 최적화된 활성을 보인다[1,2]. 리소좀에는 여러 종류의 가수분해 효소인 protease, nuclease, glycosidase, lipase, phosphatase 등이 존재한다. 이러한 효소들은 조면 소포체에서 합성되어 골지체를 거쳐 골지체의 트랜스면에 운반되고, 형질막이 생성되면서 수송소포를 통해서 방출한 후 분해한다. 리소좀의 물질 분해 단계는 크게 두 가지로 나뉜다. 첫째, 세포 내 이입(endocytosis) 작용 및 세포 근처에 존재하는 이물질 또는 세균을 세포 내로 흡입하는 식세포 작용(phagocytosis) 단계이다. 둘째, 자식작용(autophagy)을 통해 자기 소화과정에서 나오는 물질을 선택적으로 분해하는 단계이다[3-6]. 따라서 최근 보고에서 리소좀 내 단일 단백질이 아닌 리소좀 전체를 그대로 추출한 후 멜라닌 탈색 및 함량 감소를 관찰하였을 뿐 아니라 세균의 활성 저

해, 세포노화 억제, 항암 활성 등도 보고되었다[7-9]. 이러한 리소좀의 멜라닌 탈색 활성은 기존 미백 기능성 화장품 소재들과는 달리 멜라닌 생성 기전 억제보다는 기 생성된 멜라닌의 탈색을 통한 의한 미백 효능으로 과색소 침착 피부, 기미, 주근깨 치료등에도 활용될 수 있을 것이다.

멜라닌 색소는 피부 기저층의 멜라닌세포(melanocyte)에서 합성된다. 자외선(UV)에 의해 피부각질형성세포가 자극되면 DNA 손상이 유발되고, 이 때 p53 단백질은 α -MSH를 분비한다. 분비된 α -MSH가 표피 기저층의 멜라닌세포의 세포막에 위치하는 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하면 c-AMP 농도를 증가시켜 최종적으로 microphthalmia associated transcription factor (MITF)생성을 촉진한다. 이는 궁극적으로 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2)등을 합성한다. 멜라닌 생합성 과정은 tyrosinase 효소에 의해 기질인 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), DOPA quinone으로 산화되는 기작을 시작으로 여러 단계의 생화학 반응을 거쳐 최종 멜라닌이 합성된다 [10-12]. 이렇게 합성된 멜라닌은 멜라노좀(melanosome)에 축적된 후 인접한 각질형성세포(keratinocyte)로 다시 전달

됨으로 피부 각질층이 적갈색을 색을 띠게 된다[13,14]. 멜라닌은 눈, 머리카락, 피부색을 결정하며 자외선에 의해 발생하는 free radical을 소거하고 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 주로 담당한다[15]. 하지만 과도한 자극으로 생성된 멜라닌은 기미, 주근깨, 과색소 침착 등과 같은 피부 트러블을 유발하며, 심할 경우 세포 사멸 및 피부암까지 발생하기도 한다[16].

피부 표피 각질층에서의 피부장벽은 외부로부터 피부를 보호할 뿐만 아니라 피부의 수분 유출을 막아 보습 유지에 매우 중요하다[17]. 그러나 기존 화학적 미백 소재들은 오랜 기간 사용에 따른 피부 발진, 백반증, 색소이상 등과 같은 부작용을 초래하고, 피부 장벽의 손상을 유발시킨다[18]. 따라서 본 연구에서는 기존 미백 화학 소재가 가지고 있는 부작용을 개선하기 위해 B16F10 세포를 이용하여 난백 리소솜의 미백기능과 피부재생 및 피부장벽 강화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용한 난백 lysosome-related organelle extract (LOE)는 전북대학교 화학공학부에서 다음과 같은 방법으로 제조되었다. 닭의 난백에서 밀도차를 이용하여 lysosome-related organelle (LO)를 추출 한 뒤 lysis buffer (0.1% NP-40, 5mM DTT, 0.1mM PMSF)와 lysosome을 1 : 1 비율로 혼합하여 혼합물을 10 min 동안 vortexing 한 후 얼음 위에서 30 min 동안 반응시켰다. 이 후 혼합물을 4 °C, 10 min, 13,000 rpm으로 원심 분리하고, 상층액만 사용하여 LOE를 추출하였고 LOE 추출물은 난백 리소솜 내 존재하는 효소의 양을 기준으로 정량하여 사용하였다.

2.2. 세포 배양

본 연구에서 사용된 난백 LOE의 미백 연구에서 사용된 B16F10 마우스 흑색종 유래 세포는 (주한국세포주은행 (Korea)에서 분양받아 사용하였고, 피부장벽 강화 연구를 위해 사용한 인간 유래 각질형성세포는 HaCaT 세포는 고려대학교 생명공학부(Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin (Welgene, Korea) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Korea)에서 37 °C, 5% CO₂ 조건하에 배양하여 사용하였다.

2.3. 세포독성 평가

난백 LOE의 세포 독성 영향을 평가하기 위해 B16F10 세포를 이용하여 cell counting kit-8 assay (CCK-8 assay, DoGen bio, Korea)를 수행하였다. 24 well plate에 5.0 × 10⁴ cells/well로 세포를 분주한 후 24 h 동안 배양하여 안정화시켰다. 이 후 배양액을 제거하고 200 nM α-MSH (Sigma-Aldrich, USA)와 각 농도별 난백 LOE를 세포에 처리한 후 24 h 동안 배양시켰다. 그 후 배양액을 제거하고 phenol red가 없는 DMEM과 CCK-8 reagent를 10 : 1 비율로 희석한 용액을 분주하여 30 min 동안 반응시켰다. 반응 시킨 후 450 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. B16F10 세포에서 멜라닌 함량 평가

난백 LOE의 멜라닌 함량을 평가하기 위해 6 well plate를 사용하여 B16F10 세포를 3.5 × 10⁴ cells/well로 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 200 nM 농도의 α-MSH를 난백 LOE와 함께 동시 처리하고 약 72 h 동안 멜라닌 합성을 촉진시켰다. 양성대조군은 arbutin (100 μg/mL)을 사용하였다. 배양된 세포는 PBS를 이용하여 세척한 후 현미경으로 멜라닌 색소의 함량 변화를 관찰한 후 trypsin/EDTA (Gibco, Canada)를 처리하고 원심 분리하였다. 이후 1N NaOH를 이용해 80 °C에서 1 h 동안 반응한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 측정

멜라닌 생합성 단계에 관여하는 mRNA 유전자 발현을 분석하기 위해 6 well plate에 B16F10 세포를 2.0 × 10⁵ cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 안정화 시킨 후 200 nM α-MSH와 난백 LOE를 농도별로 동시에 처리하여 2 h 동안 멜라닌 합성을 자극시켰다. 이 후 Trizol reagent (Ambion, USA)를 1mL씩 분주하여 cell lysis를 진행한 후 chloroform (Sigma-Aldrich, USA) 200 μL를 처리하였다. 그 후 14,000 rpm에서 4 °C, 15 min 조건하에 원심 분리하여 상층액을 isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) 400 μL와 1 : 1 혼합하고 다시 원심분리 한다. 상층액을 제거 한 뒤 75% EtOH를 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 원심 분리하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1.5 μg/mL로 정량하였다. Revertra Ace Kit (Toyobo, Japan)을 이용 역전사 한 후 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 Taqman probe는 Table 1에 별도 표기하였다.

Table 1. Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor	Mm00434954_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1

2.6. TEER 측정

난백 LOE에 의한 세포투과도를 측정하여 피부장벽 조절 효과를 확인하기 위해 EVOM² meter (Epithelium Volt Ohm Meter 2, 300523, WPI, USA) 장비를 사용하였다. 측정 전 EVOM² 장비를 0 ohm 값으로 보정한 후 20 min 전 기기를 작동시켜 준비하였다. 측정 시 STX2 전극을 transwell plate의 insert well과 receiver well plate에 수직으로 삽입하여 세포의 TEER 값 ($\text{ohm}(\Omega) \times \text{cm}^2$)을 측정하였다. 먼저 transwell plate 1.12 cm² (Corning, USA)에 HaCaT 세포를 well 당 약 2.0×10^4 cell이 되도록 분주하여 24 h 동안 세포를 안정화시켰다. 이후 LOE 단독 처리군 및 20 ng/mL tumor necrosis factor-alpha (TNF- α , Sigma-Aldrich, USA)와 LOE를 동시에 처리하여 최대 24 h 동안 측정하였다. Transwell plate에서 insert well에는 500 μL receiver well은 1.5 mL씩 분주 하였다. 음성대조군은 세포 투과도가 증가하여 피부장벽에 영향을 미치는 4 μM deoxynivalenol (DON)을 사용하였다. 모든 실험값은 3회 반복 측정하여 측정하였고, 0 h의 TEER 값을 기준으로 각 조건별 TEER 측정값 변화를 백분율로 나타내어 통계 처리하였다.

2.7. Cell Migration Assay

난백 LOE에 의한 cell migration 평가는 6 well plate에 HaCaT 세포를 4.0×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 세포이동을 관찰하기 위해 200 μL tip의 끝을 이용하여 scratch를 형성한 후 20 ng/mL TNF- α 와 난백 LOE를 농도별로 동시에 처리하고 세포이동 속도와 scratch 면적의 변화를 관찰하였다. 음성대조군은 DON (4 μM)을 사용하였다. 현미경으로 촬영한 후 image J (image processing and analysis in Java, NIH)를 이용하여 세포 이동 거리(closure rate)를 측정하였다.

2.8. 통계처리

본 실험에서 모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균과 표준편차로 나타내었으며, 분석결과 통계처리는 student's

t-test를 수행하여, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의적인 결과로 판단하였다.

3. 실험 결과

3.1. 난백 LOE의 세포 독성 평가

우리는 선행연구를 통해 계란 난백의 리소좀 추출물이 멜라닌 색소의 분해 활성을 가지고 있음을 규명하였다. 그러나 멜라닌 생성 억제 및 피부재생, 피부장벽 강화 등의 효능은 거의 알려지지 않아 본 연구를 통해 새로운 기능을 규명하고자 하였다. 따라서 우리는 먼저 마우스 흑색 종 세포인 B16F10 세포에서 LOE에 의한 세포 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 CCK-8 assay를 진행하였다. 세포 독성을 측정할 결과 α -MSH 단독 처리군의 경우 최대 1000 nM 까지 세포 독성이 관찰 되지 않아 안전성이 확인되어 α -MSH 처리 농도를 200 nM 농도로 설정하였다(Figure 1A). LOE와 α -MSH 동시 처리군에서 LOE 40 mg/mL 농도 조건에서 세포독성을 관찰한 결과 약 $29.5 \pm 3.3\%$ 까지 세포 생존률이 감소하였고, LOE 20 mg/mL 농도 조건에서는 세포 독성이 거의 관찰되지 않았다(Figure 1B). 따라서 B16F10 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 동시 처리 조건 LOE 20 mg/mL과 α -MSH (200nM)를 최대농도로 설정하여 이후 모든 실험을 진행하였다.

3.2. LOE에 의한 세포 내 멜라닌 함량 측정 및 MITF mRNA 유전자 발현 분석

LOE의 미백 효과를 확인하기 위해 먼저 melanin contents assay를 수행하였다. B16F10 세포에서 α -MSH (200nM)로 멜라닌 합성을 자극한 후 LOE를 농도별로 동시 처리하여 세포 내 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과 α -MSH 단독 처리군은 멜라닌 함량이 무처리군 대비 $221.1 \pm 12.6\%$ 증가하여 정상적으로 멜라닌 정상적으로 멜라닌이 합성되었다고 판단하였다. 동일한 조건에서 양성대조군인 arbutin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과 멜라닌 함량이 α -MSH 처리군 대비 $127.2 \pm 6.5\%$ 로 유의적으로 감소하였다. 또한 LOE를 각각 5, 10, 20 mg/mL 농도로 처리한 결과 α -MSH 처리군 대비 멜라닌 함량이 $61.5 \pm 4.0\%$, $61.4 \pm 7.3\%$, $58.3 \pm 8.3\%$ 로 5 mg/mL 저농도 조건부터 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다(Figure 2A and B). 또한 LOE에 의한 멜라닌 합성 억제 기전을 확인하기 위해 tyrosinase 전사 조절 인자인 MITF의 mRNA 발현을 확인하였다. α -MSH 처리군에서

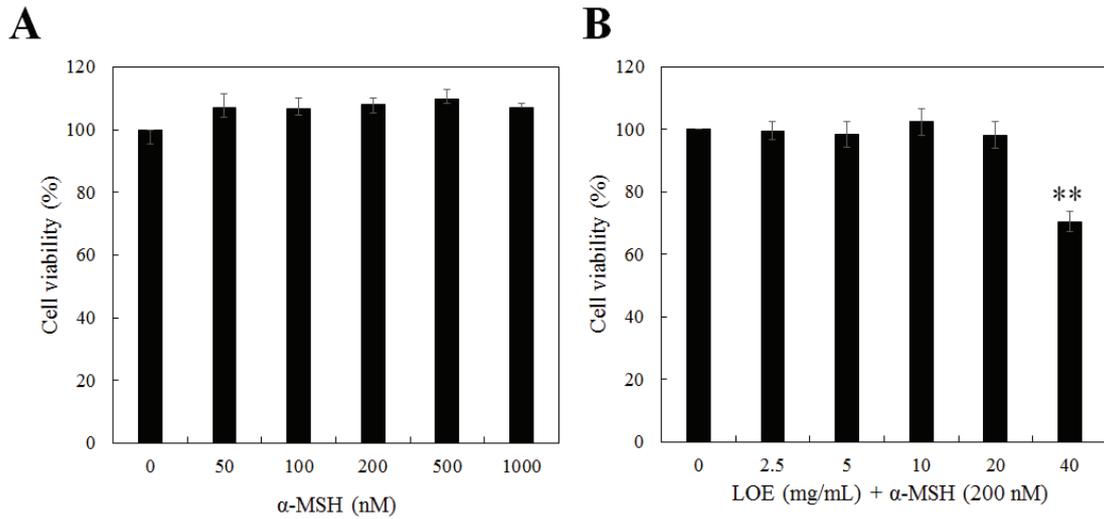


Figure 1. Viability of α -MSH and lysosome-related organelle extract (LOE) in B16F10 cells with CCK-8 assay. (A) Cytotoxicity of α -MSH was not observed up to 1000 nM condition. (B) Cytotoxicity of co-treatment with α -MSH (200 nM) and LOE from 0 to 40 mg/mL concentration. Cytotoxicity of LOE was not observed up to 20 mg/mL concentration condition. Data are presented as mean \pm SD of three experiments. ** $p < 0.001$, compared to control.

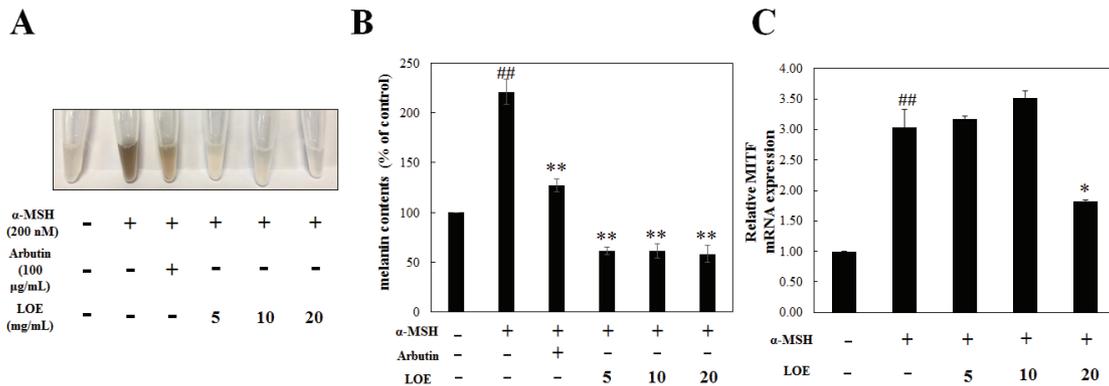


Figure 2. Inhibitory effect of melanin contents by LOE in B16F10 cells. (A) Melanin contents assay were conducted to evaluate the inhibitory effect of LOE compared to the arbutin (100 μ g/mL). Cells were treated with LOE for 3 days in presence of α -MSH (200 nM). (B) Analytical data for inhibitory effect on melanin contents by LOE in B16F10 cells. (C) Inhibitory effect on the MITF mRNA expression by LOE in the presence of α -MSH. The results are expressed as mean \pm S.D of data obtained three independent experiments. ## $p < 0.01$, compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to α -MSH treated group.

MITF mRNA 발현은 3.03 ± 0.3 배 증가하였고, LOE 5, 10 mg/mL 농도 처리군에서는 큰 변화가 없었고, 20 mg/mL 처리군에서는 α -MSH 처리군 대비 1.83 ± 0.1 배로 약 39.7 \pm 3.2% 감소 효과를 확인하였다(Figure 2C). 또한 LOE는 TRP-1, tyrosinase의 mRNA 발현도 미미하게 억제하였으나 통계적 유의성은 없었다(data not shown). 따라서 LOE는 B16F10 세포에서 α -MSH 자극에 의해 증가된 멜라닌 합량

을 감소시켰고, 멜라닌 합성에 중요한 전사 조절 인자인 MITF 유전자 발현에 관여함을 알 수 있었다.

3.3. LOE에 의한 피부장벽(Skin Barrier) 강화 효과

LOE에 의한 피부 장벽 강화 및 개선 효능을 확인하기 위해 인간 유래 각질형성세포인 HaCaT 세포를 사용하여 상피 세포 간 장벽에 미치는 영향을 TEER assay 로 관찰

하였다. 피부장벽을 약화시키는 대조군으로 4 μM DON을 사용하였다[19]. 먼저 LOE 소재의 피부장벽 강화 효과를 관찰하기 위해 LOE를 각각 농도별로 단독 처리하여 TEER 측정값의 변화를 관찰한 결과, 0 h 및 2 h 조건에서는 음성대조군인 DON 및 LOE 처리군에서 TEER 측정값의 변화가 크게 관찰되지 않았다. 그러나 4 h 조건부터 DON 처리군은 무처리군 대비 86.6 \pm 4.2%로 감소되었고, LOE를 각각 5, 10, 20 mg/mL 농도 조건으로 세포에 처리한 결과 TEER 측정값이 무처리군 대비 각각 121.4 \pm 2.0%, 129.6 \pm 1.5%, 144.3 \pm 6.4% 로 증가하였으며, 이후 시간에서도 LOE 처리 시 TEER 측정값이 유의적으로 증가 하는 것을 확인하였다(Figure 3A). 또한 우리는 염증반응 유발인자인 TNF- α 를 처리하여 피부염증을 유발한 후 LOE에 의한 TEER 측정값의 변화를 관찰하여 염증억제 및 피부장벽

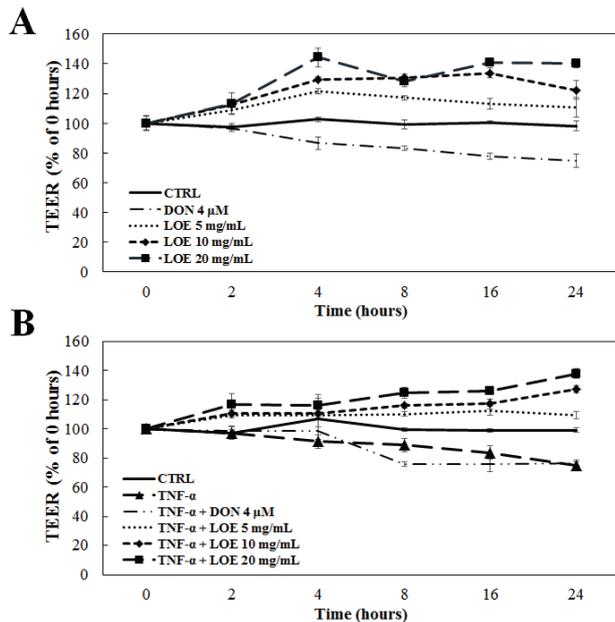


Figure 3. The TEER value ($\text{ohm}(\Omega) \times \text{cm}^2$) was measured to determine cell permeability of LOE in HaCaT keratinocyte cells. (A) Cell permeability was observed in each concentration of LOE using DON (4 μM) as negative control. LOE significantly increased TEER value as a dose dependent manner in HaCaT cells. (B) We observed changes in cell permeability under the each concentration of LOE in the presence of TNF- α (20 ng/mL) causing the skin inflammation. Although TEER value was decreased in TNF- α induced HaCaT cells, LOE increased the TEER value in same condition, strongly indicating its ability to reinforce skin barrier. The results are expressed as mean \pm SD of data obtained three independent experiments.

강화를 관찰하고자 하였다. TNF- α 처리군, TNF- α (20 ng/mL) 및 DON 동시 처리군에서는 8 h 이후 TEER 저항값이 무처리군 대비 88.9 \pm 2.5%, 75.9 \pm 4.5% 수준으로 감소하였다. 그러나 TNF- α 와 LOE 5, 10, 20 mg/mL을 동시처리한 군에서는 8 h 처리 조건에서 TEER 값이 무처리군 대비 110.1 \pm 1.7%, 116.1 \pm 1.5%, 124.9 \pm 3.5%로 증가됨을 알 수 있었다. 또한 24 h 처리 조건에서는 무처리군 대비 109.6 \pm 2.0%, 127.4 \pm 2.5%, 138.1 \pm 3.5%로 증가되었다 (Figure 3B).

3.4. LOE의 Cell Migration 촉진 효과

LOE의 세포 증식 및 세포 이동 촉진을 관찰하기 위해 cell migration assay를 수행하였다. 배양된 HaCaT 세포주에 scratch로 wound를 만든 후 세포의 이동 속도를 비교하여 closure rate를 측정하였다. 무처리군에서는 6 h 처리 조건에서 9.8 \pm 1.6%, 12 h 조건에서는 51.9 \pm 1.2% 만큼 wound 공간이 채워졌다. 반면 음성대조군으로 사용된 TNF- α (20 ng/mL) 처리군은 6 h 처리 시 31.0 \pm 2.0% 수준으로 세포 이동이 관찰되었지만, 12 h까지 거의 변화가 없었다. 동일한 조건에서 TNF- α 와 DON (4 μM)을 12 h 까지 동시 처리한 결과, 세포증식 및 이동에 의한 closure rate가 약 23.4 \pm 0.6%로 세포이동이 억제되었음을 알 수 있었다. 반면 LOE를 각각 5, 10, 20 mg/mL 농도로 6 h 처리한 결과, 11.3 \pm 1.1%, 33.6 \pm 5.4%, 37.8 \pm 0.9%로 세포 이동이 촉진되었고, 12 h까지 LOE를 처리 하였을 때 100% 까지 wound 공간이 모두 채워졌다(Figure 4A and B). 위 결과들을 종합해 볼 때 LOE 소재는 미백 뿐 아니라 세포 이동을 촉진시켜 상처 치유 또는 피부 장벽 개선에 도움을 주는 화장품 소재로 개발될 수 있을 것이다.

4. 고 찰

계란 난백의 리소솨은 protease, nuclease, glycosidase, lipase, phosphatase 등을 가지고 있으며, 난백 리소솨에서 추출한 효소복합체(LOE)의 멜라닌 분해 효과 등의 보고는 있었으나 세포 수준에서의 멜라닌 합성억제 및 피부 장벽 기능의 강화에 연구는 거의 이뤄지지 않았다[7-9]. 따라서 본 연구에서는 계란 난백에서 분리한 리소솨으로부터 LOE를 추출하였고, melanin contents assay를 통해 멜라닌 합성 억제에 의한 미백효능 활성을 확인하였으며 나아가

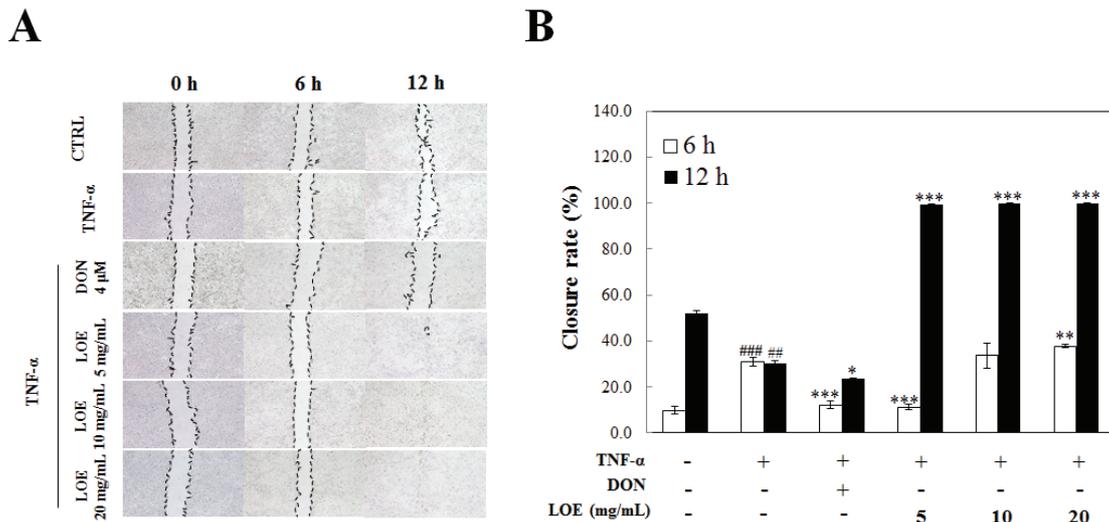


Figure 4. The effect on cell migration of LOE in TNF- α induced HaCaT cells. **(A)** Representative images of cell migration assay at each time. Wound caused by scratching with a 200p tip was healed by LOE, due to faster cell migration than the control group at 12 h. **(B)** This data was obtained by statistically processing a blank area and closure rates were analyzed by image J software. The results are expressed as mean \pm SD of data obtained three independent experiments. $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$, compared to control, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.01$, compared to TNF- α treated group.

피부장벽 강화 및 세포 이동 촉진 효과를 통해 신규 화장품 소재로서의 개발 가능성을 규명하였다. 먼저 미백효능을 검증하기 위해 B16F10 세포주를 사용하여 α -MSH 단독 처리군과 α -MSH (200 nM)과 LOE 동시 처리군에서 세포독성을 확인하였다. 그 결과 α -MSH와 LOE 40 mg/mL 동시 처리군에서 $29.5 \pm 3.3\%$ 세포독성이 나타났고, LOE 20 mg/mL을 최대 농도로 설정하여 미백 효능 평가 실험을 진행하였다. 먼저 LOE에 의한 멜라닌 생성량을 측정된 결과, 5 mg/mL LOE 부터 뛰어난 멜라닌 합성 억제 효과가 관찰되었다. 그러나 멜라닌 생합성 효소인 tyrosinase 활성 억제 평가에서는 LOE에 의한 억제 효과가 나타나지 않았다(data not shown). 이는 LOE의 멜라닌 생성 억제 효과가 tyrosinase 효소 활성 저해에 의한 것이 아님을 의미한다. 또한 우리는 멜라닌 생성 기작의 조절 가능성을 확인하기 위해 tyrosinase 유전자 발현의 전사 조절인자를 관찰하였다. LOE는 α -MSH 처리군 대비 MITF 유전자 mRNA 발현을 약 $39.7 \pm 3.2\%$ 수준까지 감소 시켰고, TRP-1 및 tyrosinase mRNA 발현은 미미하게 감소하였으나 유의성은 없었다(data not shown). 이에 따라 LOE는 멜라닌 탈색능에 의한 세포 내 멜라닌 함량 감소 뿐 아니라 MITF 유전자 발현 억제에도 부분적으로 관여하는 것으로 이해된다. 그러나 LOE 내 존재하는 다양한 단백질 분해효소들에 의한

α -MSH 펩타이드 분해 또는 이로 인한 멜라닌 신호전달 저해로 인한 멜라닌 생성 억제 효과도 배제할 수 없을 것이다.

LOE의 피부장벽 및 피부 재생 효과를 관찰하기 위해 TEER 측정과 cell migration assay를 수행하여 관찰하였다. LOE는 시간 변화에 따라 유의성 있게 TEER 측정값을 증가시켰고, TNF- α 를 처리한 염증 조건에서도 무처리군 대비 TEER 측정값이 증가됨을 관찰하였다. 따라서 염증반응으로 약화된 피부장벽이 LOE에 의해 회복됨을 알 수 있었다. 마지막으로 cell migration assay를 통해 상처 치유 효과를 확인하였다. HaCaT 세포를 충분히 배양한 후 scratch로 wound를 만든 뒤 세포 이동에 따라 채워지는 면적을 측정하여 closure rate를 측정된 결과, 무처리군 대비 TNF- α 처리군에서 낮은 상처 치료 복구율을 보인 반면, LOE는 유의성 있게 세포 이동을 촉진시켜 상처 치료 복구율이 모두 증가된 것을 관찰하였다. 최근 리소좀과 세포노화 억제의 연관성에 대해 vATPase 효소에 의한 리소좀 활성화가 미토콘드리아 기능을 증진시켜 세포 재생 및 기능 회복에 관여한다는 연구결과가 보고되었다[20]. 따라서 우리는 리소좀의 보다 정확한 미백 및 피부재생 활성연구를 위해 피부장벽 및 세포이동 촉진에 대한 추가 연구계획을 수립하였고, 최종적으로 천연물 유래 물질인 LOE 소재를 미백 화

장품 조성물에 적용함으로써 높은 기능을 나타내는 미백 화장품 원료로 개발하고자 한다. 특히 이러한 천연물 유래 효소의 소재화에 있어 효소 안정화 기술 개발은 필수적이다. 또한 효소는 생물에 필수적인 촉매제로 거의 모든 생체 내 생화학 반응에 관여하기 때문에 효소 안정화는 물론 담지 과정에서 화학적 공정을 최소화하여 함유량 및 기능성을 보장하는 담지화 기술 확보 또한 매우 중요하다. 이러한 추가연구를 통해 향후 리소솜 추출물인 LOE의 미백 효능 및 피부 장벽 강화 효과 까지 보장하는 새로운 천연물 유래 화장품 소재 가능성을 기대한다.

Acknowledgment

본 과제는 산업통상자원부 (MOITE)의 (안정화 효소를 이용한 화장품 원료 개발, P0006145) 지원을 받아 수행되었습니다.

Reference

1. A. Ballabio, The awesome lysosome, *EMBO Mol. Med.*, **8**(2), 73 (2016).
2. P. Saftig, J. Klumperman, Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**(9), 623 (2009).
3. C. Settembre, C. Di Malta, V. A. Polito, M. G. Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S. U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D. C. Rubinsztein, and A. Ballabio, TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis, *Science.*, **332**(6036), 1429 (2011).
4. G. Kroemer, M. Jäättelä, Lysosomes and autophagy in cell death control, *Nat. Rev. Cancer*, **5**(11), 886 (2005).
5. H. Zhu, J. Fan, Q. Xu, H. Li, J. Wang, P. Gao, and X. Peng, Imaging of lysosomal pH changes with a fluorescent sensor containing a novel lysosome-locating group, *Chem. Commun.*, **48**(96), 11766 (2012).
6. C. J. Galloway, G. E. Dean, M. Marsh, G. Rudnick, and I. Mellman, Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**(11), 3334 (1983).
7. J. H. Yoon, Y. H. Kim, and J. H. Min, Evaluation of *in vitro* function by subcellular distribution of lysosomal and peroxisomal protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **17**(1), 244 (2017).
8. J. H. Yoon, Y. H. Kim, and J. Y. Ahn, H. C. Lee, S. J. Oh, B. W. Chung, and J. H. Min, Melanin reduction by peroxidase activity in lysosome-related organelle extracts from hen egg whites, HeLa cells, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Toxicol.*, **11**(4), 441 (2015).
9. J. H. Yoon, J. M. Park, K. J. Kim, Y. H. Kim, and J. H. Min, Antimicrobial activity of the cell organelles, lysosomes, isolated from egg white, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(11), 1364 (2009).
10. P. Aroca, K. Urabe, T. Kobayashi, K. Tsukamoto, and V. J. Hearing, Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation, *J. Biol. Chem.*, **268**(34), 25650 (1993).
11. C. Bertolotto, R. Busca, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia, *Mol. Cell. Biol.*, **18**(2), 694 (1998).
12. S. A. D'Mello, G. J. Finlay, B. C. Baguley, and M. E. Askarian-Amiri, Signaling pathways in melanogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(7), 1144 (2016).
13. J. A. Mackintosh, The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin, *J. Theor. Biol.*, **211**(2), 101 (2001).
14. K. Van Den Bossche, J. M. Naeyaert, and J. M. Lambert, The quest for the mechanism of melanin transfer, *Traffic*, **7**(7), 769 (2006).
15. M. Brenner, V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol.*, **84**(3), 539 (2008).
16. Y. Yamaguchi, J. Z. Beer, and V. J. Hearing, Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer, *Arch. Dermatol. Res.*, **300**(S1), 43 (2008).
17. A. V. Rawlings, C. R. Harding, Moisturization and

- skin barrier function, *Dermatol. Ther.*, **17**(S1), 43 (2004).
18. G. R. Mokhlis, B. A. Matis, M. A. Cochran, and G. J. Eckert, A clinical evaluation of carbamide peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use, *J. Am. Dent. Assoc.*, **131**(9), 1269 (2000).
 19. U. K. Cho, J. H. Choi, and H. S. Hwang, Deoxynivalenol impair skin barrier function through the down regulation of filaggrin and claudin 1/8 in HaCaT keratinocyte, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **22**(6), 693 (2017).
 20. H. T. Kang, J. T. Park, K. Choi, Y. Kim, H. J. C. Choi, C. W. Jung, Y. S. Lee, S. C. Park, Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence, *Nat. Chem. Biol.*, **13**(6), 616 (2017).